

효소면역흡착시험을 이용한 경북서부지역의 돼지 흉막폐렴에 대한 항체분포조사

서희진, 배성수, 김대원, 김봉환*

경상북도가축위생시험소 서부지소, 경북대학교 수의과대학*

Survey on the distributions of swine pleuropneumonia antibodies by ELISA in Kyongbuk western area

Hee-Jin Seo, Sung-Su Bae, Dae-Won Kim, Bong-Hwan Kim*

Western Branch, Kyongbuk Veterinary Service Laboratory,
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University*

Abstract

The study was performed to investigate the distributions of swine pleuropneumonia in Kyongbuk western area by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Sera collected from 400 slaughtered pigs in 3 slaughter houses during the period from May 1999 to october 1999 were tested to detect antibodies against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 and 5.

The optimal dilution of CBE antigen, conjugate and serum for this ELISA were determined 1:400, 1:20,000, 1:100, respectively. The optimal dilution of OMP antigen, conjugate and serum for this ELISA were determined 1:100, 1:20,000, 1:200, respectively.

Cut-off value in this ELISA was determined by mean absorbance (at 492 nm) of negative control sera added with the triple value of the standard deviation. Cut-off value in ELISA by CBE and OMP antigen were 1.134 and 1.217, respectively.

By the ELISA, positive reaction rates to *A. pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 for CBE antigen were 38.8% and 18.8%, and for OMP antigen were 42.8% and 23.5% of the 400 samples, respectively.

Key words : *A. pleuropneumoniae*, ELISA, Slaughtered pigs

서 론

돼지 흉막폐렴의 원인체인 *actinobacillus*

*pleuropneumoniae*는 호흡기 계통의 primary pathogen으로써 돼지에 대해 숙주 특이성이 매우 높으나, 일광, 건조, 소독제 등에 감수성이

높으므로 숙주를 벗어나서는 장기간 생존할 수 없다. 이균은 돼지에 감염하여 비출혈, 개구호흡, 복식호흡, 습성기침, 견좌자세, 청색증, 고열, 식욕감퇴 등을 보인다. 감염 후 첫 4일동안에 폐사 위험이 가장 높다. 특히 임상증상 발현 후 24시간이내에 폐사하는 경우가 많고, 이 시기를 거친 돼지는 만성형으로 변하여 보균돈이 된다^{1~3)}.

돼지 흉막폐렴은 현재 세계적으로 발생되고 있으며, 국내에서는 1970년대 말에 처음 발생이 확인된 이후 전국적으로 확산되어 양돈산업에 많은 경제적 피해를 입히고 있다^{1,2,4,5)}. 본 병은 밀집사육, 환경불량, 기후의 급변, 갑작스런 환경변화 등 스트레스 요인에 의해 생체의 저항력이 저하되었을 때 발병하여 성장지연, 사료효율의 저하 및 폐사 등으로 양돈업에 많은 경제적 손실을 초래한다⁶⁾. 또한 이 병은 돈군의 면역상태에 따라 심급성, 급성 및 만성의 경과를 취하며, 전파는 주로 돼지간의 호흡기 감염이다⁵⁾. 여름철에는 발생이 적지만 겨울이나 이른 봄에 많이 발생하며, 약 3개월령의 비육돈에 주로 발생한다^{4,7)}. 주요 감염원은 건강 보균돈 또는 만성 감염돈이며, 발생이 없던 농장에 이 병이 침입하는 경우는 이들의 입식에 기인하며 좋은 사양관리 상태에서는 불현성 감염형으로 전파되나, 갑작스런 기후의 변화나 수송 등의 stress와 연계될 때 발병하는 경우가 대부분이다. 특히 *A pleuropneumoniae*는 swine influenza virus, Aujeszky's disease virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* 등에 이어 2차 감염균이 될 수 있으므로 우리나라에서처럼 전 돈군에 마이코프라즈마성 폐렴이 만연하고 있는 경우에 이 질병으로 인한 피해는 더욱 커진다^{1,3,11)}. 특히 이 병인체는 잠복기가 매우 짧기 때문에 수송도중 감수성 돈이 보균돈과 접촉하여 폐사하거나, 만성감염돈이 급성형으로 발전하는 경우가 많다^{2,4,7)}.

*A pleuropneumoniae*의 혈청형은 Nicolet⁸⁾와 Gunnarsson 등⁹⁾에 의해 serotype 1~5형이 보고된 후 현재 12종이상의 혈청형이 분류 보고되었다^{10~13)}. 국내에서는 1979년 처음 보고된 후 지속적으로 발병되고 있으며^{14,15)}. 박 등¹⁴⁾은

도축돈에서 흉막폐렴균을 분리하여 이들이 혈청형 2, 3, 4, 5형임을 보고한 바 있으며, 도축돈의 항체가 조사에서 161두중 86두(53.42%)가 혈중 항체가 양성돈으로 국내 돈군의 항체 보유율이 높다고 하였다. 또한 예¹⁵⁾는 경기지역의 흉막폐렴 이환돈으로부터 *H pleuropneumoniae*를 분리하고 혈청형은 2와 5형임을 보고하였고, 이 등¹⁶⁾은 경북지방의 흉막폐렴의 발생을 보고하였으며 예¹⁷⁾는 육성돈의 항체를 조사하여 142두중 64두(45.1%)에서 항체가 인정되었으며, 모돈에서는 65두중 60두 즉 92.3%가 양성이었다고 하였다. 그리고 Yang 등¹⁸⁾은 혈중 항체 조사에서 비육돈 468두중 58.5%가, 모돈 53두중 86.8%가 양성이었음을 보고한 바 있다. 또한 정¹⁹⁾은 경북지방에서 분리한 38주의 분리주중 47.4%가 혈청형 2이고, 44.7%가 혈청형 5로 분리군주의 대다수가 serotype 2와 5였고, 그외 혈청형 7, 10, 12도 각각 2.6%씩 나타났음을 보고한 바 있다.

*A pleuropneumoniae*의 병원성 차이는 혈청형에 따라 현저하게 나타나고, 교차방어능이 생기지 않아 효과적인 면역을 위해서는 그 지역에서 유행하는 혈청형을 파악하여 이를 이용한 백신을 하는 것이 효과적이다^{9,20)}. 그러나 백신접종으로 항체역가를 일정 수준으로 유지하면 *A pleuropneumoniae*의 감염에 의한 폐렴증과 치사율을 줄이는 데는 효과적이지만, 근본적인 예방은 되지 못한다²¹⁾.

*A pleuropneumoniae*의 혈청학적 진단법으로는 평판응집시험^{22,23)}, 시험관 응집시험^{9,24)}, 환륜침강시험^{22,25)}, 간접혈구응집반응²⁶⁾, 면역확산시험^{27~29)}, 보체결합반응^{30~32)}, 간접형광항체시험²³⁾, 라텍스응집반응³³⁾, 효소결합면역흡착시험^{34~37)} 등이 사용되며, 최근에는 더 정확한 혈청형 동정을 위해 단크론항체³⁸⁾도 이용되고 있다.

*A pleuropneumoniae*의 혈청학적 진단법중 시험관응집반응시험은 술식이 간단한 장점이 있어서 혈청검사에 가장 보편적으로 사용되고 있고, 국내 보고자료도 주로 이 방법으로 항체검사를 수행하였다³⁹⁾. 그러나 이 방법은 시간이 많이 소요되고 재현성이 떨어지며, 비특이 반응이 나타나는 단점이 있어 여러 가지 보완방

법이 보고된 바 있다³⁹⁾. 그리고 심 등³⁹⁾은 micro-agglutination을 고안하여 시험관응집반응에 비해 시료와 노력이 절약되고 혈청반응을 대량으로 수행할 수 있다고 보고한 바 있다. 또한 CF test가 널리 이용되어 왔지만, CF test는 IgM 항체에 많이 좌우되므로 이 병의 호발연령인 3개월 전후의 감염돈은 CF test에 음성으로 나타나게 되는 예가 늘어나고 있다고 한다^{32,40)}. CF test는 위양성반응률은 낮지만 위음성반응률이 높은 것으로 알려져 있는^{26,41,42)} 반면, coagglutination test와 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 CF test에 비해 위양성반응률은 높지만 위음성반응률이 낮아 돈군의 감염 여부를 가려내는데에 큰 이점이 있는 것으로 알려지고 있다^{43~46)}. 또한 최근에는 ELISA법이 널리 이용되고 있으며, capsular polysaccharide, outermembrane protein, long-chain lipopolysaccharide antigen으로 type-specific antibody를 검출하는 방법이 계속 개발되고 있다^{34,35,44,45,47~50)}.

본 실험에서는 경북서부지역의 돼지 흥막폐렴의 분포를 알아보기 위하여 ELISA법을 이용하여 경북서부지역 도축돈을 대상으로 *A pleuropneumoniae* serotype 2와 5에 대한 혈중 항체가를 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

Dr. Nielsen(National Veterinary Laboratory, Denmark)으로부터 분양받은 *actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2(S 1536)와 5(K 17)를 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 5 μ g/ml 농도로 첨가한 PPLO agar(Difco)에 도말하고 37°C candle jar에서 overnight 배양하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

항원

CBE : Crude boiling extract(CBE)는 Radacovici 등⁴⁹⁾의 방법에 준하여 제조하여 사용

하였다. 요약하면 공시균주 *A pleuropneumoniae* serotype 2와 5를 NAD가 첨가된 PPLO agar에 접종하여 37°C에서 overnight 배양한 후 0.5% formalin이 함유된 0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.3)으로 집균하여 4°C에서 18시간 방치하고, PBS로 washing한 후 균부유액은 MacFarland No. 10에 맞추어 100°C, 1시간 boiling 한 후 12,000×g에서 45분간 centrifugation하여 supernatant를 모아 0.22 μ m pore size filter로 여과하여 -20°C에 보관하면서 ELISA의 항원으로 사용하였다.

OMP : 국립수의과학검역원에서 분양받은 균체외막 단백질을 사용하였다. 이 항원은 *A pleuropneumoniae* serotype 2와 5균체를 sonicator로 처리하여 추출한 outer membrane protein을 N-laurylsarcosinate로 처리하여 얻은 정제항원으로 -20°C에 보관하면서 ELISA 항원으로 사용하였다.

대조혈청

양성대조혈청 : 국립수의과학검역원으로부터 분양받은 mycoplasma, pasteurella, *A pleuropneumoniae* serotype 2와 5가 혼합감염된 양성혈청을 각각 사용하였다.

음성대조혈청 : University of Minnesota Swine Center로부터 분양받은 12예의 *A pleuropneumoniae* 음성혈청과 초유섬취전의 돼지 혈청 및 수의과학검역원으로부터 분양받은 SPF 돼지혈청 등 16예를 각각 사용하였다.

공시재료

1999년 5월부터 1999년 10월 사이에 경북서부지역의 도축장 출하돈 중 400두의 혈액을 채취하여 혈청분리를 한 후 비동화하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

CBE antigen 및 conjugate titration : 본 실험에서 *A pleuropneumoniae*의 CBE antigen

및 conjugate의 적정농도를 결정하기 위해 항원을 1:100부터 2배 계열회석하여 100 μ l씩 분주하여 coating 한 후 positive serum과 negative serum으로 checkerboarded titration하여 maximum positive-negative ratio(P/N max)를 나타내는 회석배수를 optimal antigen dilution으로 결정하였으며, conjugate는 1:5,000부터 1:40,000배까지 회석하여 결정하였다.

Optimal serum dilution : 혈청의 적정회석 농도는 Trottier 등⁵¹⁾의 방법에 따라 positive serum과 negative serum에 대하여 maximum P/N ratio를 나타내는 회석농도로 정하였다.

ELISA : *A. pleuropneumoniae*의 혈청검사를 위한 ELISA 법은 Trottier 등⁵¹⁾과 Radacovici 등⁴⁹⁾의 방법에 따라 실험하였다. 요약하면, 항원은 적정농도를 결정하여 96 well EIA plate (Costar)에 0.1M carbonate buffer(pH 9.6)를 이용하여 100 μ l씩 분주하여 4°C에서 18시간 동안 흡착시킨 후, 세척액으로 3회 세척하여 2% bovine serum albumin 동량을 넣고 37°C에서 1시간 반응시켜 blocking한 후 세척액으로 3회 세척하였다. 혈청은 적정회석 배수로 회석하여 100 μ l씩 분주하였고 검사시료 1개당 duplicate로 검사하였으며 실험의 유의성을 위해 각 plate 당 blank, positive, negative well을 각각 두었고, 시료는 37°C에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. Conjugate는 antipig IgG peroxidase conjugate(Sigma, A5670)를 적정 회석 배수로 회석하여 시험에 공하였으며, 반응은 37°C에서 1시간 수행한 후 다시 세척하였다. Substrate로는 OPD(0.4 μ g/ml, 30% H₂O₂ 0.4 μ l/ml)용액을 사용하여 각 well에 100 μ l씩 가하고, 실온에 10분간 반응시킨 후 2.5M H₂SO₄로 반응을 정지시켜 490nm에서 ELISA reader (Anthos ht III)로 optical density(OD)치를 측정하였다. 시험과정 중 사용한 세척액은 0.05% Tween-20(Sigma)이 함유된 PBS로 하였고, 검사혈청 및 conjugate 회석용액 또한 0.05% Tween-20 PBS를 사용하였으며, 모든 세척과정은 3회 반복 실시하였다.

결 과

1999년 5월부터 1999년 10월 사이에 경북서부지역의 도축장출하돈중 400예의 돼지혈청으로 ELISA법을 이용하여 돼지 흉막폐렴에 대한 혈중항체를 조사한 결과는 아래와 같다.

CBE 항원에 대한 ELISA 역가

ELISA를 적용하기 위하여 antigen 및 conjugate를 titration한 결과는 Fig 1 및 Fig 2에 있는 바와 같다.

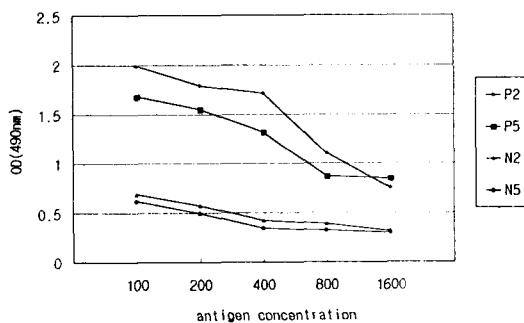


Fig 1. Optimal dilution of antigen concentration for ELISA (CBE antigen).

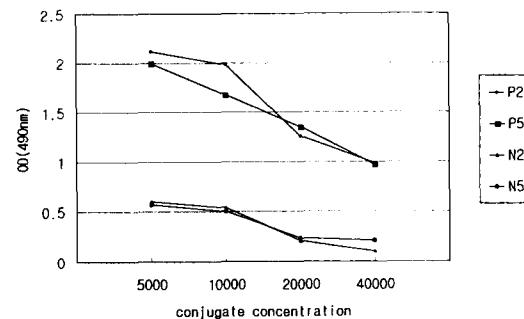


Fig 2. Optimal dilution of conjugate concentration for ELISA(CBE antigen).

Positive serum과 negative serum에 대한 checkerboarded titration한 결과 CBE antigen은 1:400의 회석에서, conjugate는 1:20,000배 회석에서 maximum positive-negative ratio를 나타내었다.

본 실험에서 혈청의 적정 희석배수를 정하기 위하여 항원은 1:400배, conjugate는 1:20,000 배로 희석하여 양성혈청 및 음성혈청을 1:50 배부터 1:800배까지 2배 단계 희석하였으며 각 희석단계별 OD치를 조사한 결과는 Fig 3에 있는 바와 같다.

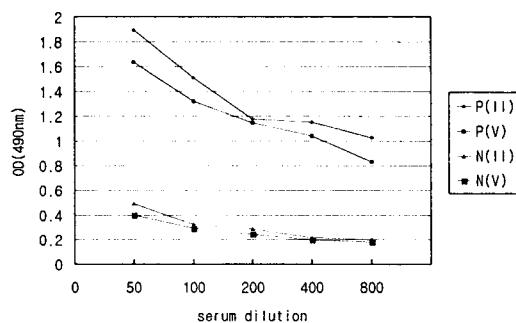


Fig 3. Determination of optimum serum dilution in ELISA(CBE antigen).

혈청 100배 희석에서 positive는 혈청형 2의 경우 1.512, 혈청형 5의 경우 1.315이고, negative는 0.321, 0.289로 P/N ratio의 최대값이 각각 4.7과 4.6으로 나타나 본 실험에서는 혈청 희석배율을 1:100으로 결정하였다.

16예의 negative control sera를 항원 1:400, 혈청 1:100, conjugate를 1:20,000배로 희석하여 ELISA OD치를 얻어 cut-off value를 결정하였다. Cut-off value는 음성 OD치의 평균값에 3배의 표준편차값을 더한 값을 기준으로 정하여 이보다 높은 OD치를 양성으로 판정하였

으며 음성 OD치의 평균값에 2배의 표준편차를 더한 값 이상을 의양성으로 판정하였다. 혈청형 2의 경우 양성은 1.134이상, 의양성은 0.931 이상을, 혈청형 5의 경우 양성은 0.975이상, 의양성은 0.785이상으로 결정하였다.

이상의 cut-off value를 기준으로 400예의 공시혈청을 검사한 결과는 Table 1과 같다.

400예의 혈청중 serotype 2의 경우 양성은 155두, 의양성이 86두, 음성은 159두로 각각 38.8%, 21.5%, 39.7%이었으며 혈청형 5에 대해서는 양성이 74두, 의양성은 168두, 음성은 158두로 각각 18.5%, 42.0%, 39.5%를 나타내었으며, 혈청형 2에 비해 혈청형 5의 항체 양성을 다소 낮게 판찰되었다.

OMP 항원에 대한 ELISA 역가

국립수의과학검역원으로부터 분양받은 Outer membrane protein antigen은 사용설명서에 명시된 희석배수인 1:100으로 희석하여 사용하였고, conjugate를 titration한 결과는 Fig 4에 있는 바와 같이 1:20,000배 희석에서 maximum positive-negative ratio를 나타내었다.

OMP 항원을 사용한 ELISA에서 혈청의 적정희석배수를 정하기 위해 항원 1:100, conjugate 1:20,000배 희석에서 양성혈청 및 음성 혈청을 1:50배부터 1:800배까지 2단계 희석하였으며 각 희석단계별 OD치는 Fig 5에 있는 바와 같이 혈청 200배 희석에서 positive는 serotype 2의 경우 1.870, serotype 5의 경우 1.580이고, negative는 각각 0.572와 0.472로

Table 1. Result of ELISA to *A. pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 (CBE antigen)

District	Serotype 2			Serotype 5		
	Positive	Dubious	Negative	Positive	Dubious	Negative
KC	51	20	29	26	39	35
KH	47	19	34	13	48	39
KI	23	22	55	16	40	44
KT	34	25	41	19	41	40
Total	155	86	159	74	168	158
(%)	(38.8)	(21.5)	(39.7)	(18.5)	(42.0)	(39.5)

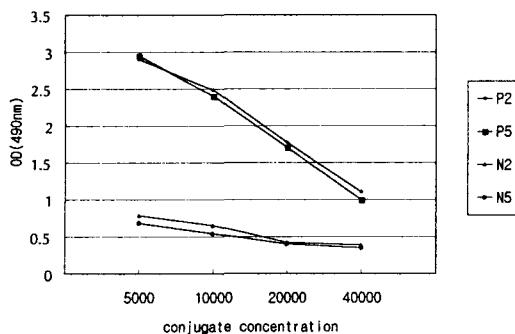


Fig 4. Optimal dilution of conjugate concentration in ELISA (OMP antigen).

P/N ratio의 최대값을 각각 3.3, 3.5로 나타나 본실험에서는 혈청희석배율을 1:200배로 결정하였다.

이상에서 결정된 항원 1:100, conjugate 1:20,000, 혈청 1:200의 희석배율로 총 16예의 negative serum에 대한 ELISA OD치를 얻어

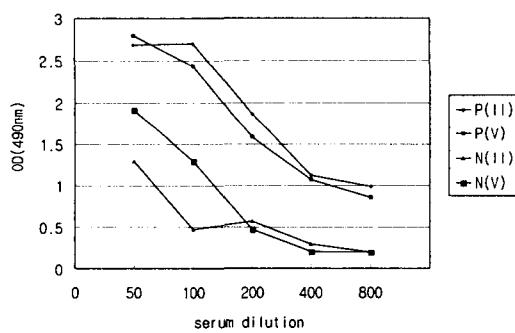


Fig 5. Determination of optimum serum dilution in ELISA(OMP antigen).

cut-off value를 결정하였다. Cut-off value는 앞에서와 같이 음성 OD치 평균값에 3배의 표준편차값을 더한 값을 기준으로 정하여 이보다 높은 OD치를 양성으로, 음성 OD치의 평균값에 2배의 표준편차값을 더한 값이상을 의양성으로 판정하였다. 혈청형 2의 경우 양성은 1.217이상, 의양성은 0.985이상이며 혈청형 5의 경우 양성은 1.045이상, 의양성은 0.823이상으로 판정하였다.

이상의 cut-off value를 기준으로 1999년 5월부터 1999년 10월 사이 경북서부지역의 도축돈 400예의 혈청으로 ELISA 검사한 결과는 Table 2와 같다.

Serotype 2의 경우 양성은 171두, 의양성은 75두, 음성은 154두로 각각 42.8%, 18.7%, 38.5%로 나타났으며 serotype 5의 경우 양성은 94두, 의양성은 151두, 음성은 155두로 각각 23.5%, 37.8%, 38.7%를 차지하여, 혈청형 5형에 비해 혈청형 2형의 항체 양성률이 다소 높게 관찰되었다.

CBE와 OMP 항원에 의한 ELISA 결과를 비교해 보면 Table 3에 나타낸 바와 같이 CBE 항원을 사용한 경우 혈청형 2에서 155두로 38.8%가 양성인데 반해 OMP 항원을 사용한 경우에는 171두인 42.8%가 양성으로 나타나 양성률이 다소 높은 것으로 관찰되었다. 혈청형 5의 경우에는 CBE 항원 사용시 양성이 74두인 18.5%로 나타났고, OMP 항원 사용시는 94두인 23.5%가 양성으로 나타나, 혈청형 2에서와 같이 OMP 항원에 대한 항체 양성률이 다소 높이 나타났다.

Table 2. Result of ELISA to *A. pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 (OMP antigen)

District	Serotype 2			Serotype 5		
	Positive	Dubious	Negative	Positive	Dubious	Negative
KC	59	23	18	30	34	36
KH	49	15	36	21	45	34
KI	27	19	54	20	37	43
KT	36	18	46	23	35	42
Total	171	75	154	94	151	155
(%)	(42.8)	(18.7)	(38.5)	(23.5)	(37.8)	(38.7)

Table 3. Relationship between the result of CBE antigen and OMP antigen to *A. pleuropneumoniae* serotype 2 & 5 in ELISA

Antigen	Serotype 2			Serotype 5		
	Positive	Dubious	Negative	Positive	Dubious	Negative
CBE antigen	155	86	159	74	168	158
OMP antigen	171	75	154	94	151	155

고 찰

돼지 흉막폐렴은 *A. pleuropneumoniae*에 의한 호흡기질병으로 출혈성, 괴사성, 섬유소성 흉막폐렴이 특징이고, 현재 전 세계적으로 발생되며 국내에서는 1970년대 말에 처음 발생하고 된 후 전국적으로 확산되고 있으며 밀집사육, 환경불량, 기후의 급변, 갑작스런 환경변화 등의 스트레스가 가해져 생체의 저항력이 저하되었을 때 발병하여 폐사를 비롯해 성장지연과 사료효율의 저하를 초래하여 양돈가에 큰 경제적 손실을 초래하고 있다^{1,2,5,6)}.

Schultz 등⁵²⁾은 Iowa주 597개 농장에 대해 *A. pleuropneumoniae*의 CF항체가를 조사한 결과 이중 417개 농장이 양성임을 확인하였으며, Yang 등¹⁸⁾은 비육돈 468두와 모돈 53두에 대한 혈중 항체조사 결과 각각 58.5%, 86.8%의 양성률을 보고한 바 있다. 박 등¹⁴⁾은 도축돈에서 흉막폐렴균을 분리하여 이들이 혈청형 2, 3, 4, 5임을 보고한 바 있으며 정¹⁹⁾은 폐렴병변을 나타내는 도축돈의 폐 6.4%에서 *A. pleuropneumoniae*를 분리하였고, 분리주중 혈청형 2와 혈청형 5가 각각 47.4, 44.7%로 대부분을 차지하였음을 보고한 바 있다.

이상의 자료를 기초로 하여 본 실험에서는 돼지 흉막폐렴의 방제를 위하여 *A. pleuropneumoniae* 감염돈의 혈중 항체를 조사하기 위해 1999년 5월부터 1999년 10월 사이에 경북 서부지역의 도축돈 400두를 대상으로 하여 2종류의 항원 즉, CBE와 OMP 항원을 사용하여 ELISA를 실시하였다.

본 실험에서는 ELISA에 앞서 ELISA법에 적용되는 여러 요인들을 표준화하기 위해 항원

의 농도, 혈청희석배수, conjugate희석배율 등에 대한 예비 시험과 또한 혈청학적 면역반응에서 항원과 항체비율은 반응의 감수성에 중요한 영향을 미치며 항원의 농도가 지나치게 높거나 낮으면 반응이 저하된다고 알려져 있어⁵³⁾ 예비시험으로 항원과 항체의 반응조건에 대한 실험을 한 결과 *A. pleuropneumoniae*의 CBE 항원의 경우에는 항원 1:400, conjugate 1:20,000, 혈청 1:100으로 반응을 시켰을 때 P/N ratio의 최대값을 나타내었고, OMP 항원의 경우에는 항원 1:100, conjugate 1:20,000, 혈청의 희석배수 1:200으로 반응시켰을 때 P/N ratio의 최대값을 나타내었기에 본 실험의 반응 조건으로 각각 결정하였다. 또한 흉막폐렴에 대한 결과판정은 16예의 음성혈청의 평균 OD 치에 3배의 표준편차값을 더한 값(mean OD + 3 SD) 이상을 양성으로, 의양성은 음성혈청의 평균 OD치에 2배의 표준편차값을 더한 값(mean OD + 2 SD)으로 결정하였다. CBE 항원의 경우 serotype 2는 1.134 이상을 양성으로, 0.931 이상을 의양성으로 판정하였고 serotype 5는 0.975 이상을 양성으로, 0.785 이상을 의양성으로 판정하였으며, OMP 항원의 경우 serotype 2는 1.217 이상을 양성으로, 0.985 이상을 의양성으로, serotype 5는 1.045 이상을 양성으로, 0.823 이상을 의양성으로 판정하였다.

이상의 방법으로 경북 서부지역의 도축돈 400예의 혈청검사를 실시한 결과 CBE 항원에 의한 항체양성은 serotype 2와 serotype 5가 각각 155두(38.8%), 74두(18.8%)로 나타나 혈청형 2형에 대한 항체 양성률이 혈청형 5형에 비해 다소 높은 것으로 관찰되었으며, 이는 이 등¹⁶⁾의 실험성적과는 다소 차이를 보였다. 또한

OMP 항원에 의한 항체 양성은 serotype 2가 171두(42.8%), serotype 5가 94두(23.5%)로 나타나 CBE 항원의 경우에 비해 항체 양성률이 다소 높은 것으로 판찰되었다. 국내 도축돈의 *A pleuropneumoniae*의 항체 양성률을 박 등¹⁴⁾은 53.4%, 예 등¹⁵⁾은 45.7%, 그리고 양 등¹⁸⁾은 58.5%로 보고한 바 있어 본 실험 결과와는 다소 차이가 있으며, 혈청형별로는 2형이 항체 양성률이 높이 판찰되는데에 반해 5형은 항체 양성률은 비교적 낮으나 항체 의양성률이 높게 판찰되었다.

이상의 실험에서 얻어진 결과를 종합해 보면 CBE 항원에 의한 ELISA 보다 OMP 항원에 의한 ELISA에서 항체 양성률이 다소 높게 판찰되어, 돼지 흉막폐렴의 신속하고 정확한 진단 및 항체 검출을 위하여 좀 더 정제된 type-specific한 항원등에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료되었다.

결 론

1999년 5월부터 1999년 10월 사이에 경북서부지역의 도축돈 400두를 대상으로 돼지 흉막폐렴의 원인균인 *A pleuropneumoniae* serotype 2와 5에 대한 혈중 항체를 crude boiling extract antigen 및 outer membrane protein antigen를 이용한 ELISA법으로 조사하였다.

CBE 항원을 이용한 ELISA는 항원 농도 1:400배, conjugate 1:20,000배, 혈청 희석배수 1:100으로 결정하여 400 예의 혈청을 검사한 결과 serotype 2와 5의 양성률이 각각 155두(38.8%), 74두(18.8%)를 나타내었다.

OMP 항원을 이용한 ELISA는 항원농도 1:100배, conjugate 1:20,000배, 혈청 희석배수 1:200으로 결정하여 400 예의 돼지 혈청을 검사한 결과 serotype 2와 5의 양성률이 각각 171두(42.8%), 94두(23.5%)로 나타나 CBE 항원을 사용한 경우보다는 전체적으로 다소 높게 판찰되었다.

혈청형별로는 2형이 5형에 비해 비교적 높은 항체 양성률을 나타내었고, 5형의 경우 항

체 양성률은 낮은 반면 의양성률이 높게 판찰되었다.

참고문헌

1. Schiefer B, Greenfield J. 1974. Porcine *Haemophilus parahaemolyticus* pneumonia in Saskatchewan. II. Bacteriological and experimental studies. *Can J Comp Med* 38(2) : 105~110.
2. Veary CM. 1989. *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs : A review. *J S Afr Vet* 60(1) : 56~61.
3. Nielsen R. 1977. Pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. A study of the epidemiology of the infection. *Nord Vet Med* 29 : 465~473.
4. Shope RE. 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. Experimental transmission etiology and patholog. *J Exp Med* 119 : 357~368.
5. 예재길. 1981. 섬유소성 흉막폐렴돈의 폐병 소로부터 분리한 *Haemophilus parahaemolyticus*에 관한 연구. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.
6. Nicolet J, Kouig H. 1966. Haemophilus infections. Disease of swine, 6th ed. Iowa state Univ press. 426~435.
7. Sanford SE, Josepson GKA. 1981. Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* enzootic in southeastern Ontario : Clinical, microbiological, pathlogical and some epidemiological findngs. *Can J Comp Med* 45 : 2~7.
8. Nicolet J. 1971. Sur l'hemophilose du porc. III. Differentiation serologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. *Zentralbl Bakteriol parasitenkd Infectionsskr. Hyg Abt Orig* 216 : 487~495.
9. Gunnarsson A, Biberstein EL, Hurvell B.

1977. Serologic studies on *Haemophilus parahaemolyticus(pleuropneumoniae)*: A gglutination reaction. *Am J Vet Res* 38 : 1111~1114.
10. Frey J, Nicolet J. 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* 28 : 232~236.
11. Nielsen R, O'conner PJ. 1984. Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet Scand* 25 : 96~106.
12. Nielsen R. 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet Scand* 27 : 453~455.
13. Rosendal S, Boyd DA. 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J Clin Microbiol* 16 : 840~843.
14. 박정문, 김종염, 변정옥 등. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae*의 분리, 혈청형 및 항체조사. 농시논문집(축산, 가위) 27 (2) : 45~52.
15. 예재길. 1983. 흉막폐렴에서 분리한 *Haemophilus pleuropneumoniae*에 관한 연구. 한국축산과학연구소보 2 : 1~7.
16. 이현범, 이근우, 박후열. 1984. 돼지 흉막폐렴의 발생. 대한수의학회지 24 : 99~104.
17. 예재길. 1988. 한국에서 돼지 *Haemophilus pleuropneumoniae*감염병에 관한 연구. 서울대학교 수의학 박사학위 논문.
18. Yang CK, Kim SJ, Cho SK. 1990. Studies on *Haemophilus* infection of pigs in Korea. *Kor J Vet Publ Hlth* 14(1) : 21~33.
19. 정병열. 1993. 돼지 폐렴병소에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 생물화학적 특성 및 혈청형. 경북대학교 수의대학석사학위 논문.
20. Rosendal S, Mittal KR. 1985. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. *Can J Com Med* 49 : 68~74.
21. Nielsen R. 1976. Pleuropneumoniae in swine caused by *Haemophilus parahaemolyticus* studies on the protection obtained by vaccination. *Nord Vet Med* 28 : 337~348.
22. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* 15(6) : 1019~1023.
23. Rapp VJ, Ross RF, Zimmermann Erickson B. 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am J Vet Res* 46(1) : 185~192.
24. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pig. *Am J Vet Res* 45 : 715~719.
25. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1993. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol* 18(6) : 1351~1354.
26. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J Clin Microbiol* 17(5) : 787~790.
27. Gunnarsson A. 1979. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus(pleuropneumoniae)*: Extraction of type-specific antigens. *Am J Vet Res* 30(4) : 469~472.
28. Gunnarsson A, Hurvell B, Biberstein EL. 1987. Serologic studies of porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus(pleu-*

- ropneumoniae*) : Antigenic specificity and relationship between serotypes. *Am J Vet Res* 39 : 1286~1292.
29. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1988. Quantitation of serotype-specific and cross-reaction group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests of differentiating *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotype 3, 6, and 8. *J Clin Microbiol* 17 : 787~790.
 30. Gunnarsson A. 1979b. Evaluation of different antigens in the complement fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae (parahaemolyticus)* infections in swine. *Am J Vet Res* 40 : 1564~1567.
 31. Gunnarsson A, Hurvell B. 1980. Studies of the complement fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine. *Proc IPVS* 228.
 32. Lombin LH, Rosendal S, Mitchell WR. 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med* 46 : 109~114.
 33. Mitui T, Onaga H, Nagasawa Y, et al. 1981. Studies on *Haemophilus* infection in swine. I. Application of the latex agglutination test to the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae (H parahaemolyticus)* infection. *Vet Microbiol* 6 : 339~349.
 34. Nicolet J, Paroz P, Krawinkel M, et al. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay, using and EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* 42 (12) : 2139~2142.
 35. Nielsen R, Plambeck T, Foged NT. 1991. Blocking Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *J Clin Microbiol* 29(4) : 794~797.
 36. Willson PJ, Falk G, Klashinsky S. 1987. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can Vet J* 28 (3) : 111~116.
 37. Willson PJ, Schipper C, Morgan ED. 1988. The use of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can Vet J* 29 : 583~585.
 38. Nakai T, Horiguchi Y, Kume K. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 2. *Jpn J Vet Sci* 52(3) : 533~542.
 39. 심항섭, 우종태, 조중현 등. 1994. 돼지에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청학적 진단법에 대한 비교연구. 한가위지 17(2) : 95~113.
 40. Fenwick BW. 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serology. Proc AD Leman Swine Conference(Univ of Minnesota). 21 : 9.
 41. Gottschalk M, Bilodeau R. 1995. Detectng carrier animals in herds chronically infected by *Actinobacillus pleuropneumoniae*: the detection of antibodies and the detection of the bacteria. Proc AD Leman Swine Conference(Univ of Minnesota) 22 : 82.
 42. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Detection of type specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae* infected pigs by coagglutination test. *J Clin Microbiol* 18(6) : 1355~1357.
 43. Bosse JT, Johnson RP, Rosendal S. 1990a. Capsular polysaccharide antigens for detection of sero-specific antibodies to *Actirobacillus pleuropneunoniae*. *Can*

J Vet Res 54 : 320~325.

44. Bosse JT, Johnson RP, Rosendel S. 1990b. Serodiagnosis of pleuropneumonia using enzyme-linked immunosorbent assay with capsular polysaccharide antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can J Vet Res* 54 : 427~431.
45. Gottschalk M, Altman E, Charland N, et al. 1994. Evaluation of a saline boiled extract, capsular polysaccharides and long chain lipopoly saccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 as antigens for the serodiagnosis of swine pleuropneumoniae. *Vet Microbiol* 42 : 91~94.
46. Stenbeck EI, Schirmer AL. 1994. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by on inhibition enzyme immunoassay(EIA). *Vet Microbiol* 39 : 231~244.
47. Gottschalk M, Lasalle FD, Radacovici S, et al. 1994. Evaluation of long chain lipopolysaccharide(LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet Microbiol* 38 : 315~327.
48. Nielsen R. 1995. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. *Vet Microbiol* 43 : 277~281.
49. Radacovici S, Lalliver R, Lariviere S, et al. 1992. Biochemical characterization of an antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. *Vet Microbiol* 30 : 369~385.
50. Radacovici S, Gottschalk M, Dureuil JD. 1994. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*(Serotype 1) : a readily obtainable antigen for ELISA serodiagnosis of pig pleuropneumonia. *Vet Microbiol* 39 : 219~230.
51. Trottier YL, Wright PF, Lariviere S. 1992. Optimization and Standardization of an enzyme-Linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *J clin microbiol* 30 : 46~53.
52. Scultz RA. 1989. *Haemophilus pleuropneumoniae* ; prevaleuce, serotype and serology. compendium 11 : 365~374.
53. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : A guide with adstracts of microplate applications. Dynatech Europe Brough House.